

Note technique

Dosage du gossypol par chromatographie en phase liquide à haute performance, dans les dérivés des graines de cotonniers

C. Marquié, J. Bourély

IRCT - CIRAD, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

Résumé

Après avoir rappelé les principales méthodes d'analyse du gossypol, les auteurs décrivent une méthode de dosage du gossypol libre, combiné et total dans les dérivés des graines de cotonniers, par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP).

Le gossypol libre est extrait par l'acétonitrile/eau (50/50 : V/V) et le gossypol combiné ou total par l'acide acétique glacial à 100 °C. Les solutions dans l'acétonitrile/eau sont chromatographiées par spectrométrie U.V. à 254 nm, sur colonne RP 18 avec une phase mobile composée de 38 % d'acétonitrile et de 12 % d'eau acidifiée à pH 2,6 avec de l'acide phosphorique concentré.

Ensuite, est faite une étude détaillée des conditions opératoires en comparaison avec les méthodes de référence de l'AACS, afin de justifier le protocole opératoire qui a été défini. Appliquée à plusieurs échantillons de diverses origines, la méthode AACS

conduit toujours à des résultats supérieurs à ceux de la CLHP. Elle fournit des résultats exagérés dans des échantillons renfermant peu de gossypol. Elle évalue du gossypol dans des échantillons qui n'en renferment pas.

Contrairement à la CLHP, l'AACS n'est pas spécifique car l'acétone aqueuse extrait, en plus du gossypol, des substances capables de réagir avec l'aniline et d'être dosées comme étant du gossypol. L'AACS ne peut donc pas être utilisée pour des échantillons contenant peu de gossypol, comme les dérivés alimentaires des graines de cotonniers glandless. En revanche, elle convient parfaitement pour des échantillons renfermant des teneurs en gossypol variant de 1 % à 2 %.

De par sa sensibilité, la méthode CLHP proposée permet de doser le gossypol à l'état de traces. Elle est applicable quelle que soit la teneur en gossypol de l'échantillon.

MOTS-CLÉS : Cotonnier, *Gossypium*, farines, gossypol, chromatographie, méthode.

Introduction

Le gossypol est un polyphénol toxique contenu dans les glandes à pigments des organes végétatifs des cotonniers de variétés classiques. De ce fait, l'huile issue de la trituration industrielle des graines doit être raffinée pour être rendue comestible.

Les tourteaux résiduels renferment encore du gossypol. Ils sont essentiellement destinés à l'alimentation des animaux polygastriques qui sont beaucoup moins sensibles à la toxicité du gossypol que l'homme et les animaux monogastriques.

L'absence de glande et de pigment toxique dans les graines des variétés glandless rend les farines issues de la trituration de ces graines, directement utilisables dans l'alimentation humaine. Elle confère aux cotonniers sans

glande le double caractère de plante vivrière et textile, étant à la fois source d'huile et de protéines alimentaires mais aussi de fibres textiles, au même titre que les cotonniers ordinaires.

Dans l'optique d'une commercialisation prochaine des farines de graines de cotonniers glandless, des contrôles très rigoureux sont nécessaires pour éviter les risques d'intoxication qui seraient encourus si ces produits contenaient encore du gossypol.

Par conséquent, il est indispensable de disposer d'une méthode d'analyse précise et sensible pour détecter d'éventuelles traces de gossypol dans les dérivés alimentaires des graines de cotonniers. Tel est l'objet de la présente étude.

Rappel des principales méthodes de dosage du gossypol libre et total dans les graines

Le gossypol existe dans les graines sous deux formes : la forme libre, soluble dans l'acétone aqueuse et la fraction combinée avec d'autres molécules comme la lysine. La somme du gossypol libre et du gossypol combiné constitue le gossypol total.

Méthode gravimétrique

La méthode de PODOLSKAIA (1944) est basée sur la réduction quantitative d'une solution alcaline d'oxyde de cuivre par le gossypol. Elle surévalue les résultats, du fait que des substances réductrices précipitent avec le gossypol.

Méthodes spectrophotométriques

Les méthodes spectrophotométriques sont basées sur des réactions colorées entre le gossypol et un certain nombre de réactifs, le trichlorure d'antimoine (BOATNER *et al.*, 1944) et l'aniline, (LYMAN *et al.*, 1943; SMITH, 1946; PONS, 1957, 1958 ; AOCS, 1964).

Les méthodes AOCS (American Oil Chemists Society) sont reconnues comme étant des méthodes de référence.

Dosage du gossypol libre (méthode AOCS BA 7.58, révisée 1969)

Le gossypol libre est extrait par l'acétone aqueuse à 70%, à température ambiante, pendant 1 heure. Après filtration dans une fiole jaugée de 50 ml, des prises d'essai sont prélevées en doubles exemplaires. Le premier aliquot sert de témoin. On incube le second avec 2 ml d'aniline, deux gouttes de thiourée à 10 % et une goutte d'HCl 1,2 N, au bain marie à 100° C, pour former le complexe «dianilino gossypol» jaune orange. L'intensité de la couleur de cette solution (ramenée à 25 ml avec de l'alcool isopropylique aqueux à 80 %) exprimée en densité optique, est comparée à celle de l'extrait sans aniline, mesurée à 440 nm par spectrophotométrie U.V. Le pourcentage de gossypol dans l'échantillon est calculé en se reportant à une droite étalon, établie avec du gossypol pur, qui donne les variations des taux de gossypol en fonction de la densité optique.

Dosage du gossypol total (méthode AOCS BA 8.55, corrigée 1964)

L'échantillon subit une hydrolyse pendant 6 heures à 75°C par une solution azéotrope d'acide oxalique, d'eau et de méthyl éthyl cétone, pour faire passer le gossypol combiné sous forme libre. On ajoute ensuite une solution d'acétate de baryum pour éliminer l'excès d'acide oxalique, par précipitation d'oxalate de baryum. Après

filtration, le volume de la solution est ramené à 100 ml avec de l'acétone aqueuse à 70%. L'analyse spectrophotométrique, réalisée à partir de parties aliquotes de cette solution mère, est conduite de la même manière que pour le gossypol libre, aux différences près qu'on n'ajoute ni thiourée ni HCl et que la lecture au spectrophotomètre s'effectue à 442 nm.

Méthodes chromatographiques

À des concentrations inférieures à 100 ppm, les analyses gravimétriques et spectrophotométriques ne sont pas suffisamment sensibles pour quantifier le gossypol (PONS, 1976), aussi doit-on faire appel aux méthodes chromatographiques.

Chromatographie sur couche mince (CCM)

Par CCM, EL NOCKRASHY (1970) sépare et identifie plusieurs pigments intraglandulaires des graines de cotonniers. La chromatographie sur couche mince est également utilisée par RAJU *et al.* (1967) pour purifier des dérivés silylés du gossypol, avant leur analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La silylation du gossypol par des réactifs triméthylsilylés stabilise la molécule et la rend volatile, permettant ainsi la chromatographie par CPG (RAJU *et al.*, 1967 ; CHAN *et al.*, 1983).

Chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)

D'une façon générale le gossypol, extrait par un mélange plus ou moins polaire de solvants, est chromatographié à température ambiante sur une colonne apolaire C 18 en phase inverse. Le gossypol est élué isocratiquement par une phase mobile polaire et détecté par spectrophotométrie UV.

Le tableau 1 résume les différentes méthodes de dosage, le solvant d'extraction du gossypol et les caractéristiques des colonnes et des éluants utilisés.

Hormis la méthode très récemment publiée par HRON *et al.* (1990), les méthodes chromatographiques décrites dans la littérature ne permettent de doser le gossypol que sous une seule forme, libre ou total. Cela nous a conduits à mettre au point une méthode capable de quantifier séparément le gossypol libre et le gossypol combiné ou total.

TABLEAU 1

Principales méthodes de dosage du gossypol.
The main gossypol determination methods.

Auteurs (année)	Solvant d'extraction du gossypol	Colonne (longueur x diamètre)	Phase mobile (débit)	Longueur d'onde nm
ABOU-DONIA <i>et al.</i> (1981)	Ethanol 95 %/eau/diéthyléther/ acide acétique (715/285/200/02)	μ Bondapack C18 (30 cm x 3,9 mm)	Méthanol/eau/acide phosphorique 80/20/0,1 (2 ml/min)	254
CHOI <i>et al.</i> (1982)	Acétone eau (70/30)	μ Bondapack C18 (30 cm x 3,9 mm)	Acide sulfonique-heptane 0,2% dans le tétrahydrofurane/eau : 60/40 (1 ml/min)	254
MATLIN <i>et al.</i> (1984)	Dichlorométhane	Hypersil ODS (12,5 cm x 4,5 mm)	Acétonitrile/eau/ acide acétique : 60/30/10 (2 ml/min)	290
MATLIN <i>et al.</i> (1984)	Dichlorométhane	Forme amide d'une silice aminopropyl (25 cm x 4,5 mm)	Hexane/dichlorométhane/ acétonitrile/isopropanol : 88/5/4/3 (2 ml/min)	250
SATTAYASAI <i>et al.</i> (1984)	Benzène	μ Bondapack C18 (30 cm x 3,9 mm)	Méthanol/eau acide acétique 77/20/3 (2 ml/min)	254
MAHONEY <i>et al.</i> (1985)	Hexane/acétate d'éthyl/ acide acétique (500/500/1)	μ Bondapack C18 (25 cm x 4,5 mm)	Acétonitrile/eau/ diméthyl formamide/ méthanol/acide acétique/ acide phosphorique 55/25/20/5/2/0,06 (1 ml/min : 46 mn) (1,8 ml/min : 14 mn)	270
SAMPATH <i>et al.</i> (1986)	Méthanol	Licrosop RP18 (25 cm x 4 mm)	Méthanol/eau gradient 90 % à 95 % (0,8 ml/min)	365
MATLIN <i>et al.</i> (1987)	Acétonitrile	Hypersil ODS (25 cm x 4,5 mm)	Acétonitrile/tampon phosphate 0,01 M pH 3 82/18 (2 ml/min)	254
CHAMKASEM (1988)	N,N diméthyl formamide/ eau (2/1)	μ Bondapack C18 (30 cm x 3,9 mm)	Tétrahydrofurane/eau : 60/40 plus tampon phosphate M pH 3,5 : 0,001 (1 ml/min)	254
STIPANOVIC <i>et al.</i> (1988)	Ethanol/eau/éther/ acide acétique (59/24/17/0,2)	LC18 (25 cm x 4,6 mm)	Ethanol/méthanol/isopropanol/ acétonitrile/eau/ acétate d'éthyl/diméthyl formamide/acide phosphorique : 16,7/4,6/12,1/20,2/37,4/3,8/5,1/ 0,1 (1,25 ml/min)	272
HRON <i>et al.</i> (1990)	3 amino 1 propanol/ acide acétique/ N,N diméthyl formamide 2/10/88	RP18 (15 cm x 3,9 mm)	Méthanol/eau/ acide phosphorique : 83/13/0,1	254

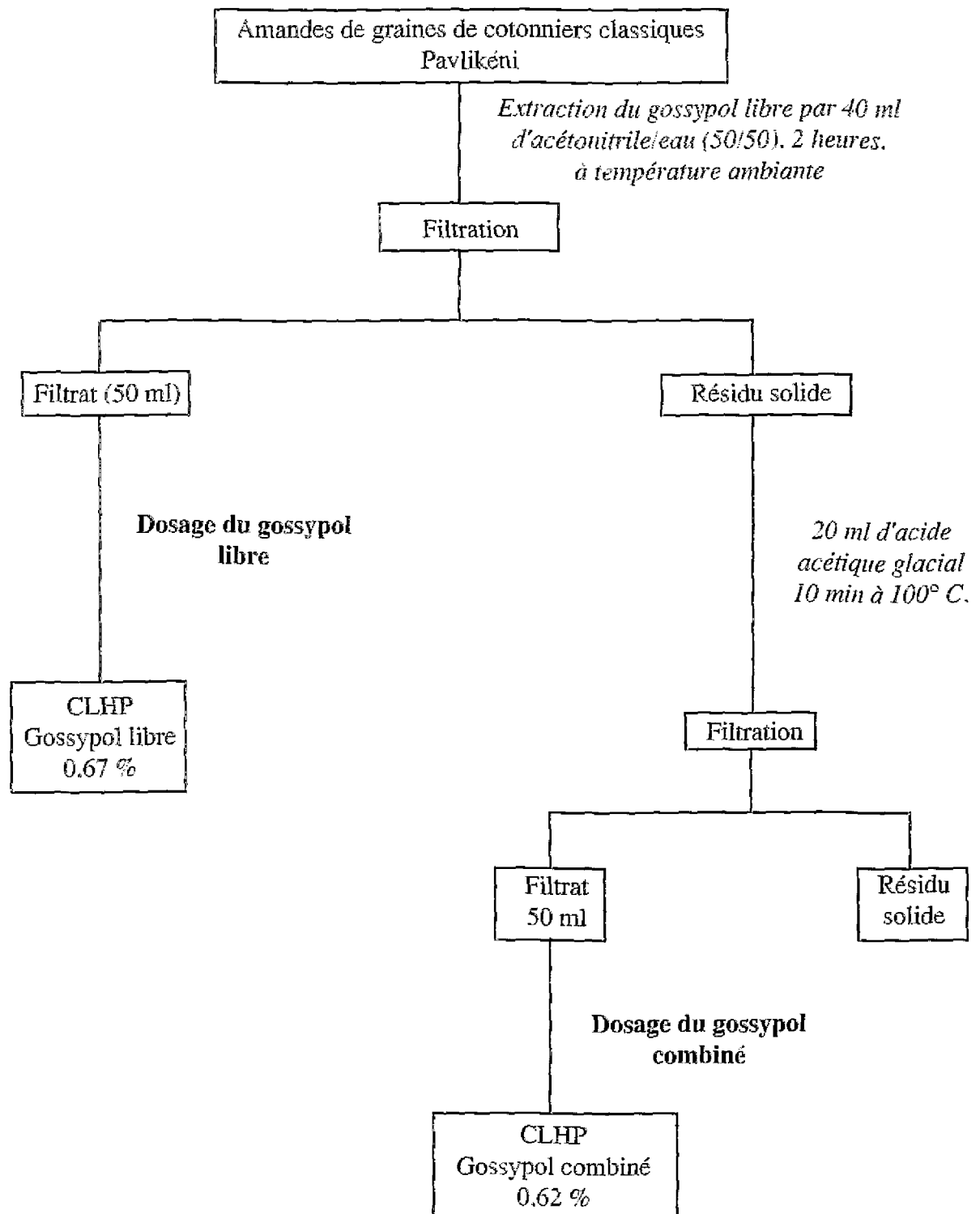


Figure 1

Dosage du gossypol libre et du gossypol combiné. Protocole opératoire.

Determination of free and combined gossypol. Procedure.

Description de la méthode CLHP proposée

Echantillons analysés

Les échantillons analysés sont les suivants :

- amandes de graines de la variété bulgare Pavlikéni (*Gossypium hirsutum* L.) ;
- farine de graines glandless, préparée par l'IRCT, utilisée pour la réhabilitation nutritionnelle d'enfants malnutris par l'INSP, à Abidjan, dans le cadre d'une étude financée par la CEE (INSP, 1986) ;
- farine de graines de cotonniers glandless commercialisée par Milouot à Haïfa (Israël) ;
- farine glandless d'origine texane ;
- farine glandless de Côte d'Ivoire, obtenue en 1986 par extraction directe à l'hexane au GERDOC, à Pessac (France) ;
- cakes et cookies préparés dans notre laboratoire, dans lesquels 20% de farine de blé ont été remplacés par de la farine de coton glandless de Côte d'Ivoire ;
- biscuits extrudés, fabriqués en atelier pilote, qui contiennent 19% de farine de coton glandless de Côte d'Ivoire ;
- pains commercialisés en Europe qui renferment de la farine de graines de cotonniers. Les proportions exactes des différents constituants ne sont pas connues ;
- graines d'*Hibiscus cannabinus* L. (Malvacée) (témoin sans gossypol).

Matériels utilisés

Nous avons utilisé un chromatographe WATERS composé d'un contrôleur automatique de gradients modèle 680 raccordé à deux pompes modèle 510, une colonne RP

18 (250 mm de longueur et 4 mm de diamètre interne, constituée de particules de granulométrie 5 µm) et un spectrophotomètre LC modèle 481. La phase mobile est constituée de 88 % d'acétonitrile et de 12 % d'eau acidifiée à pH 2,6 avec de l'acide phosphorique ; son débit d'élution est de 1 ml/min. La longueur d'onde pour la détection du gossypol est fixée à 254 nm. Les résultats sont enregistrés et calculés par un intégrateur SHIMADZU modèle CR3A.

Protocole opératoire

Choix de la prise d'essai

La prise d'essai de l'échantillon à doser est telle que la quantité escomptée de gossypol n'excède pas 3 mg dans 50 ml de solution à analyser (tableau 2).

Extraction et dosage du gossypol libre (fig.1)

Une prise d'essai de gossypol pur et une de l'échantillon à doser sont traitées pendant 2 heures, à température ambiante, par 40 ml du mélange acétonitrile/eau (50/50 ; v/v). Après filtration sur tampon de coton, les solutions sont ramenées à 50 ml dans une fiole jaugée avec de l'acétonitrile/eau (50/50 ; v/v). Ces solutions sont alors filtrées sur membrane de 0,2 µm de porosité puis injectées dans le chromatographe (fig.2).

Extraction et dosage du gossypol combiné

Après l'extraction du gossypol libre par le mélange acétonitrile/eau (50/50 ; v/v), les résidus de filtration sont repris par 20 ml d'acide acétique à 100°C durant 10 mn.

TABLEAU 2

Dosage du gossypol par CLHP Choix de la prise d'essai d'échantillon en fonction de la teneur escomptée en gossypol.

HPLC determination of free gossypol. Choice of test sample according to the expected gossypol content.

Quantité de gossypol escomptée (% matière sèche)	Prise d'essai de matière première (grammes)
Gossypol libre	
Plus de 1,5	0,2
1,0 à 1,5	0,2
0,5 à 1,0	0,3
0,1 à 0,5	0,6
0,05 à 0,1	2,0
Moins de 0,05	2,0
Gossypol total	
Plus de 1,5	0,1
0,5 à 1,5	0,2
0,1 à 0,5	0,6
0,05 à 0,1	3,0
Moins de 0,05	4,0

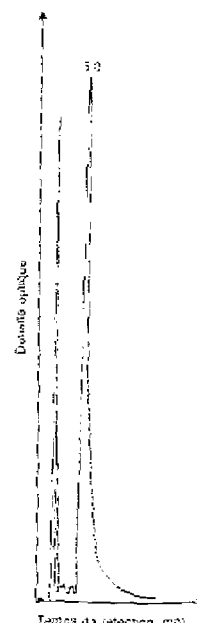


Figure 2

Chromatogramme du gossypol libre dans un échantillon d'amandes de graines de cotonniers Pavlikéni.
Chromatography of free gossypol in a sample of "Pavlikéni" cottonseed kernels.

Les extraits acides sont filtrés sur tampon de coton et complétés à 50 ml avec de l'acétonitrile/eau (50/50; v/v).

Les filtrats sont ensuite filtrés sur membrane de 0,2 µm de porosité et injectés dans le chromatographe.

Afin d'atteindre l'équilibre de dissociation du gossypol acétique dans le solvant, il est nécessaire d'attendre au minimum 3 heures avant d'injecter les solutions; celles-ci pouvant être préparées la veille pour être injectées le lendemain.

Le protocole opératoire suivi, appliqué à un échantillon de graines de cotonniers de la variété Pavlikéni, est décrit dans la figure 1.

Extraction et dosage du gossypol total

Si l'on désire doser directement le gossypol total, on procède de la manière suivante. Une prise d'essai finement broyée est hydrolysée sous reflux, durant 10 mn, au bain marie à 100°C par 20 ml d'acide acétique glacial. Parallèlement, deux prises d'essai de l'ordre de 1 à 2 mg de gossypol pur sont traitées de la même façon. Les solutions sont ensuite filtrées sur tampon de coton dans des fioles jaugées de 50 ml. Les résidus solides sont lavés plusieurs fois avec un mélange d'acétonitrile/eau (50/50; v/v). Les filtrats sont complétés à 50 ml avec le même solvant et agités.

Résultats

Dans chaque série d'analyses il est nécessaire d'inclure deux témoins de gossypol pur de concentrations différentes afin d'effectuer l'étalonnage. Après avoir chromatographié les échantillons et les solutions témoins préalablement filtrés sur membrane de 0,2 µm de porosité, l'intégrateur compare les surfaces des pics du gossypol témoin avec celles du pic du gossypol des échantillons. Un programme de l'intégrateur permet d'obtenir les résultats exprimés directement en concentrations.

Les résultats peuvent également être calculés de la manière suivante. Soit :

- T1 et T2 les quantités de gossypol pur (en mg) dans 50 ml de solutions témoins ;
- S1 et S2 les surfaces respectives des pics correspondant au gossypol des solutions témoins 1 et 2 ;
- S la surface du pic de gossypol de l'échantillon ;
- M (en mg) la prise d'essai de l'échantillon ;

la teneur en gossypol pour cent grammes d'échantillon est donnée par la formule suivante:

$$y = \frac{(T1+T2) \times S \times 100}{(S1+S2) \times M}$$

Etude détaillée des conditions opératoires en comparaison avec les méthodes AOCS

Gossypol libre. Choix du solvant d'extraction

Comme solvant d'extraction du gossypol, le mélange éthanol/eau/éther (57/27/17; v/v/v) est utilisé par SMITH (1946), l'acétone aqueuse à 70% par PONS et GUTHRIE (1949). Ce solvant est repris par l'American Oil Chemists' Society dans les méthodes officielles BA 7.58 et BA 9.55.

Dans un premier temps, nous avons utilisé l'acétone aqueuse pour extraire le gossypol libre (selon le protocole de l'AOCS) avant de le doser par CLHP. Le chromatogramme obtenu montre un très grand pic, dû au solvant, qui masque celui du gossypol. Pour pallier cet inconvénient, l'acétone et l'eau sont évaporées à sec et l'extrait est repris par de l'acétonitrile/eau (50/50; v/v) puis injecté. Dans ces conditions, du fait que l'extrait sec renferme des lipides, la dissolution du gossypol est très longue, voire même incomplète, ce qui nuit à la précision de la méthode. Aussi avons nous abandonné ce mélange de solvants au profit de celui préconisé par ABOU-DONIA *et al.* (1981), (éthanol/ eau/ éther/ acide acétique; 715/285/200/0,2). Ce solvant est plus efficace pour dissoudre le

résidu solide, mais entraîne le dédoublement du pic du gossypol, quand on attend plus de deux heures avant d'injecter la solution.

Après l'acétone, l'acétonitrile est le solvant dans lequel le gossypol est le plus stable (NOMEIR *et al.*, 1982). Nous avons déterminé que deux heures d'extraction avec l'acétonitrile/eau (50/50; v/v) suffisent pour mettre en solution 99% du gossypol libre. En outre, aucun dédoublement de pic ne se produit au cours des 24 heures qui suivent la préparation de l'échantillon (fig. 2).

C'est la raison pour laquelle, nous avons retenu l'acétonitrile/eau (50/50; v/v) comme solvant pour l'extraction du gossypol.

Influence de la nature du solvant et de la durée d'extraction du gossypol libre

La méthode AOCS utilise comme réactif l'aniline, avec laquelle d'autres substances que le gossypol sont réactives, pour donner une réaction colorée qui surévalue le résultat.

Le solvant d'extraction doit être sélectif vis-à-vis du gossypol, c'est-à-dire dissoudre la totalité du gossypol à l'exclusion d'autres composés pouvant surevaluer la teneur en gossypol.

A l'inverse, la CLHP est parfaitement sélective puisque le gossypol est identifié sous forme d'un seul pic chromatographique dont la surface est proportionnelle à la quantité de gossypol.

En faisant la différence entre les résultats des deux

méthodes et en faisant appel à différents types de solvants, nous pouvons juger si le solvant d'extraction est sélectif ou pas.

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé des amandes de graines de cotonniers de la variété classique Pavlikéni.

Nous avons comparé l'acétonitrile/eau (50/50; v/v) et l'acétone aqueuse à 70%, avec des durées d'extraction variant de 30 mn à 4 h (tableau 3).

TABLEAU 3

Dosage du gossypol libre. Influence de la nature du solvant et de la durée d'extraction.
Determination of free gossypol. Influence of the type of solvent and the duration of extraction.

Durée d'extraction	Acétonitrile/eau 50/50			Acétone/eau 70/30		
	CLHP (1)	AOCS (2)	(2)-(1)	CLHP (1)	AOCS (2)	(2)-(1)
heures						
1/2	1,09	1,03	-0,06	0,88	1,02	0,14
1	1,10	1,08	-0,02	0,90	1,07	0,17
2	1,10	1,11	0,01	0,90	1,12	0,22
3	1,16	1,18	0,02	0,95	1,13	0,18
4	1,20	1,24	0,06	0,90	1,14	0,24
Moyenne	1,13	1,13	0,00	0,91	1,10	0,18

**Extraction du gossypol libre par le mélange acétonitrile eau (50/50; v/v)*

Lorsque le gossypol est extrait par le mélange acétonitrile/eau (50/50; v/v) et dosé par HPLC et par l'AOCS, les valeurs obtenues en utilisant les deux méthodes sont pratiquement identiques (tableau 3). Cependant, pour des durées d'extraction variant de 1/2 h à 1 h, la CLHP donne des teneurs en gossypol libre légèrement supérieures à celles de l'AOCS. Au delà de deux heures d'extraction, l'AOCS donne des résultats supérieurs à la CLHP. La différence entre les valeurs obtenues avec les deux méthodes augmente en fonction de la durée d'extraction, tout en restant très faible.

Les moyennes des résultats des deux méthodes sont comparables. Ce qui montre que, quelle que soit la durée de l'extraction, le mélange acétonitrile/eau ne dissout pas de substance, autre que le gossypol, pouvant se combiner avec l'aniline.

Cependant, au delà de 2 heures d'extraction, le mélange acétonitrile/eau extrait de plus en plus de gossypol (tableau 3).

En effet, une partie du gossypol combine se libère du complexe qu'il forme avec les protéines, du fait de l'action prolongée du mélange acétonitrile/eau, qui réalise une véritable hydrolyse.

De cette observation, on peut conclure qu'il ne faut pas poursuivre l'extraction du gossypol libre avec l'acétonitrile/eau (50/50; v/v) au delà de deux heures.

**Extraction du gossypol libre avec le mélange acétone/eau (70/30)*

Pour pouvoir doser par CLHP le gossypol extrait par l'acétone aqueuse, ce solvant est évaporé à sec et le résidu est repris par 50 ml de mélange acétonitrile/eau (50/50; v/v).

Au delà de 30 mn d'extraction, la teneur en gossypol libre évaluée par CLHP demeure constante (tableau 3). Donc, une heure d'extraction par l'acétone aqueuse est largement suffisante pour assurer la complète dissolution du gossypol.

On constate que la méthode AOCS donne toujours des valeurs supérieures à la CLHP. La différence entre les résultats augmente en fonction de la durée d'extraction.

On peut déduire de nos observations que, pour des durées d'extraction variant de 1 h à 4 h, l'acétone aqueuse extrait la même quantité de gossypol libre, mais qu'elle extrait également d'autres substances qui sont dosées, par la méthode AOCS, comme étant du gossypol.

On remarque d'autre part, en comparant les résultats

obtenus par CLHP, que l'acétonitrile/eau extrait plus de gossypol que l'acétone aqueuse (1,10% au lieu de 0,90%, pour deux heures d'extraction par exemple).

Ceci explique que l'on obtienne pratiquement les mêmes résultats lorsque le gossypol est extrait par l'acétonitrile/eau d'une part et par l'acétone aqueuse, d'autre part, puis dosé par la méthode AOCS. En effet, dans le premier cas, l'extraction du gossypol est plus importante tandis que dans le second cas l'acétone aqueuse dissout, en même tant que le gossypol, d'autres substances dosées comme étant du gossypol. En outre, on remarque que la CLHP donne toujours des résultats plus élevés lorsque on utilise l'acétonitrile/eau comme solvant d'extraction au lieu de l'acétone aqueuse. Ces différences proviennent du fait qu'une partie du gossypol est détruite au cours de l'évaporation de l'acétone aqueuse.

Ces résultats montrent également que les méthodes CLHP et AOCS donnent des résultats comparables lorsque l'échantillon renferme environ 1% de gossypol.

Définition des modalités de l'analyse du gossypol combiné

Choix d'un réactif pour la décomplexation du gossypol combiné

Le gossypol se lie par ses fonctions aldéhydes aux groupements aminés des résidus d'acides aminés des protéines et forme un complexe macromoléculaire stable insoluble dans l'acétone aqueuse, le chloroforme et l'éther éthylique. L'humidité est un facteur de combinaison du gossypol libre en provoquant l'éclatement des glandes à

pigments et en augmentant les interactions amino gossypol. Une élévation de température favorise également la combinaison du gossypol. On peut supposer qu'il se produit un changement de conformation des protéines laissant accessibles un plus grand nombre de sites NH_2 , susceptibles de se fixer au gossypol libre.

Pour dégager le gossypol du complexe qu'il forme avec les protéines, on pratique une hydrolyse par l'acide oxalique (AOCS, 1964) ou par l'acide acétique en présence d'un réactif complexant comme le 3-amino 1-propanol (PONS, 1958).

Dans notre méthode, nous utilisons l'acide acétique glacial à 100°C durant 10 min pour casser les liaisons amino gossypol et former un complexe gossypol-acide acétique stable dans le mélange acétonitrile/eau (50/50; v/v).

Stabilité de la solution de gossypol après la décomplexation

Quand on traite du gossypol pur avec 20 ml d'acide acétique à 100°C pendant 10 min et que l'on complète cette solution à 50 ml avec de l'acétonitrile pur, la solution de gossypol-acétique prend une coloration jaune fluorescente dont l'intensité se maintient au cours du temps. Une telle solution ne peut donc pas être analysée par spectrophotométrie d'absorption UV.

Si l'on chromatographie, toutes les 15 min, une solution de gossypol-acétique dans l'acétonitrile/eau (50/50; v/v), on observe jusqu'à 3 heures, une augmentation de l'absorbance avec le temps et une diminution de la coloration de la solution (fig. 3).

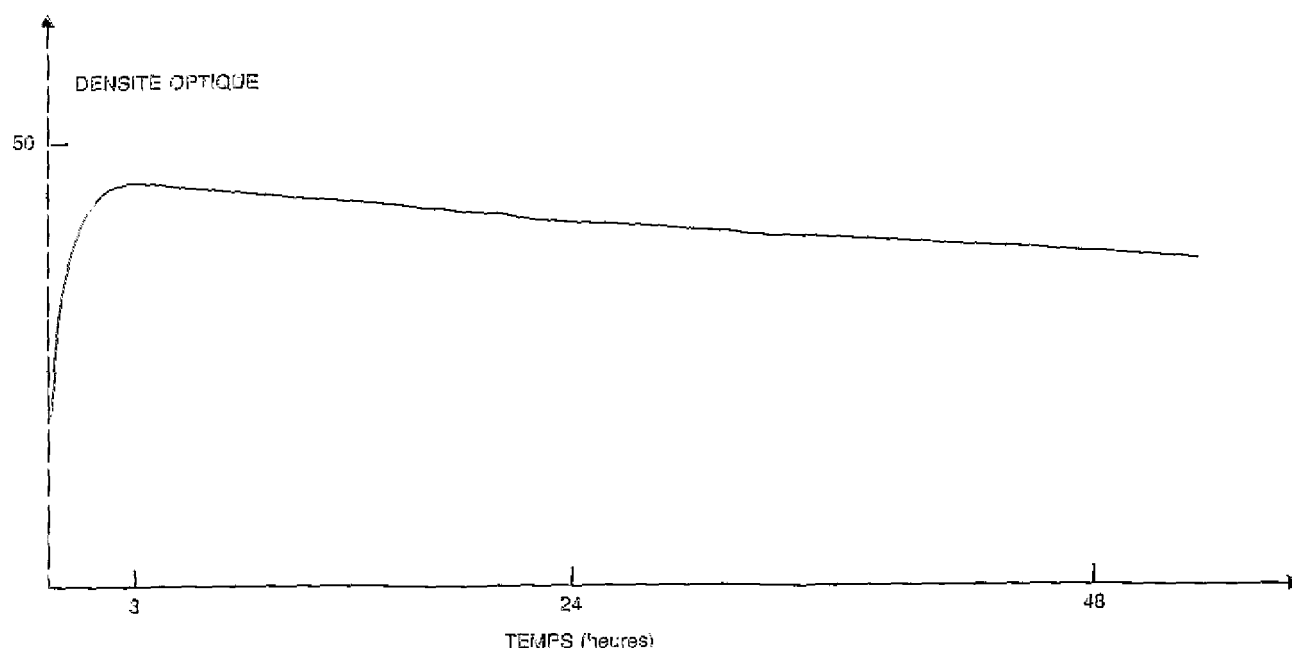


Figure 3
Evolution de la densité optique d'une solution de gossypol acétique dans l'acétonitrile/eau (50/50; v/v), obtenue à la suite du traitement de 2,5 mg de gossypol pur par 20 ml d'acide acétique glacial à 100 ° C, durant 10 min, en fonction de la durée de conservation de la solution avant l'injection.

Evolution of the optical density of an acetic gossypol solution in acetonitrile/water (50/50; v/v) according to solution storage time, 2.5 mg pure gossypol was treated with 20 ml glacial acetic acid at 100 ° C for 10 min.

Au cours des 48 h qui suivent la préparation de l'échantillon, la concentration en gossypol-acétique est relativement stable.

Par ailleurs, si l'on analyse des solutions de gossypol étalon, préparées par dilutions successives avec de l'acétonitrile/eau (50/50; v/v) d'une solution mère résultant du traitement par l'acide acétique d'une quantité connue de gossypol pur, on remarque que la courbe représentant la variation de la densité optique en fonction de la concentration en gossypol, n'est pas linéaire. En effet, en présence d'eau, le gossypol acétique se dissocie selon une réaction équilibrée qui nécessite une durée minimale de 3 heures pour se stabiliser. L'addition d'eau déplace l'équilibre dans un sens qui tend à diminuer la quantité de gossypol acétique dosée.

Le traitement par l'acide acétique du gossypol combiné est donc réalisable à condition que l'on ajoute de l'eau dans le milieu réactionnel après l'extraction et que l'on attende la durée nécessaire pour atteindre l'équilibre de dissociation du gossypol acétique (au moins trois heures).

Ces observations nous conduisent à pratiquer l'étalonnage de l'intégrateur, non pas avec des dilutions successives d'une même solution témoin de gossypol pur, mais par pesées directes de plusieurs prises d'essais de concentrations croissantes de gossypol pur. La figure 4 montre que, dans ces conditions, la variation de la densité optique en fonction de la concentration du gossypol est une fonction linéaire et suit par conséquent la loi de Lambert Beer.

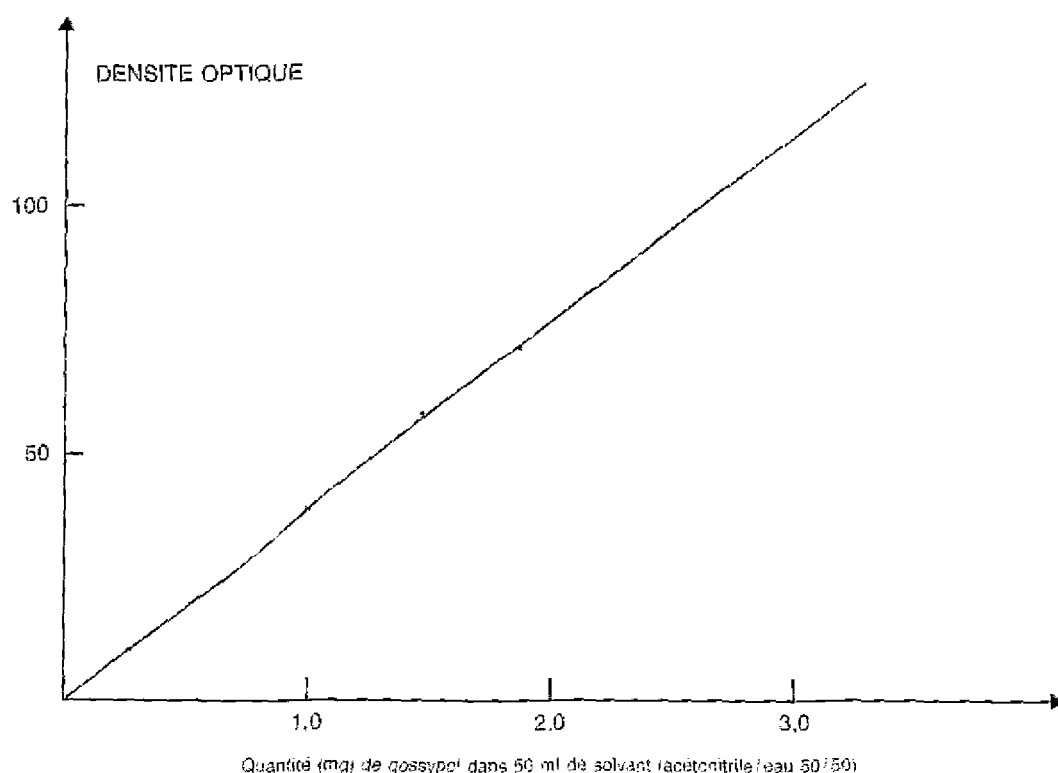


Figure 4

Variation de la densité optique, à 254 nm, de solutions de gossypol acétique en fonction de leur concentration.

Les solutions étalons sont préparées par traitement de 0,25 mg, 1,5 mg, 1,9 mg et 2,8 mg de gossypol pur par 20 ml d'acide acétique glacial à 100°C pendant 10 mn, puis complétées par 50 ml d'acétonitrile/eau (50/50; v/v).

Variation of the optical density at 254 nm of acetic gossypol solutions according to their concentration.

The standard solutions were prepared by the treatment of 0,25 mg, 1,0 mg, 1,5 mg, 1,9 mg and 2,8 mg of pure gossypol with glacial acetic acid at 100°C for 10 min and then to 50 ml with acetonitrile/water (50/50, v/v).

Cinétique de la décomplexation du gossypol combiné

Pour étudier la cinétique de la décomplexation du gossypol combiné, nous avons traité des prises d'essai de 100 mg d'amandes de graines de cotonniers Pavlikéni avec 20 ml d'acide acétique à 100°C au bain marie, pendant des temps variables de 5, 10, 20, 30 min, 1, 2, et 3 heures.

Les extraits étant chromatographiés trois heures après

leur préparation, le maximum d'absorbance est obtenu pour une durée de traitement de 10 min (fig. 5).

D'autre part à partir de 30 min de traitement, on note sur les chromatogrammes la présence (en proportions de plus en plus importantes) d'autres pics qui ne sont pas attribuables au gossypol. Ce phénomène est dû à une dégradation du gossypol et à la libération d'autres molécules que le gossypol dans le milieu réactionnel.

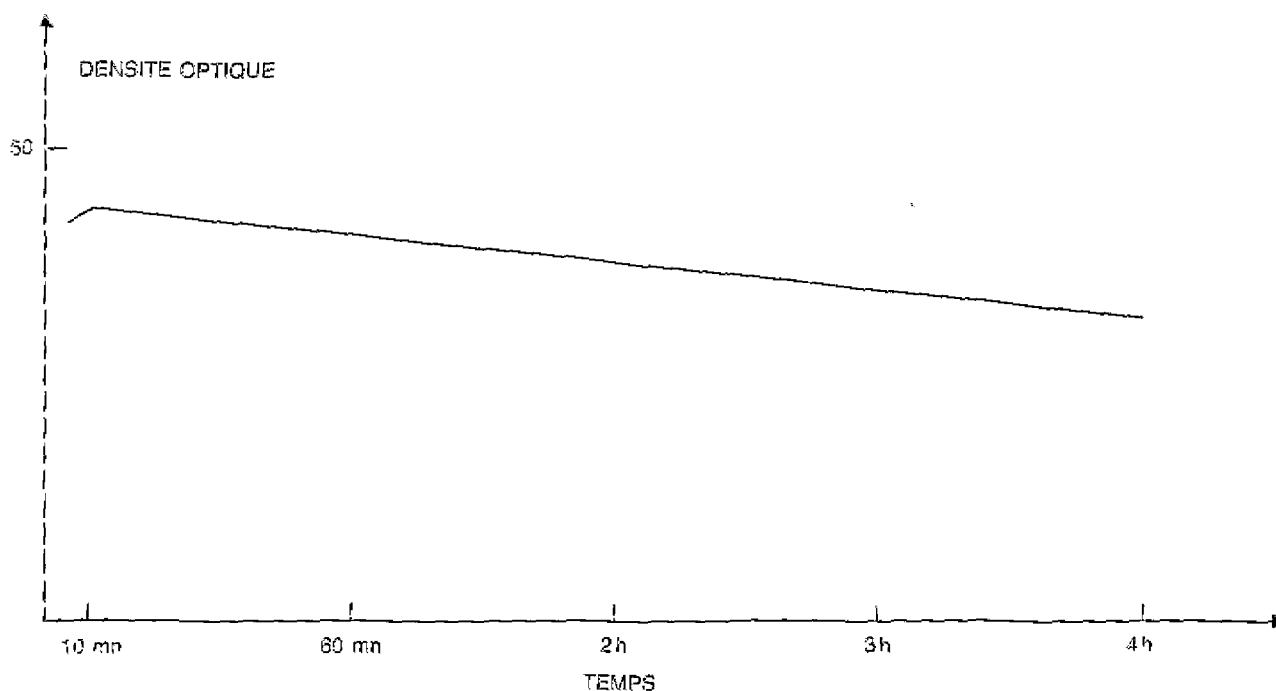


Figure 5

Variation de la densité optique, à 254 nm, en fonction de la concentration en gossypol acétique de solutions obtenues après des temps variables d'hydrolyse de 100 mg d'amandes de graines de cotonniers Pavlikéni par 20 ml d'acide acétique à 100° C.

Variation of the optical density at 254 nm according to the acetic gossypol concentration of the solutions obtained after different hydrolysis times. 100 mg of "Pavlikéni" cottonseed kernels were treated with 20 ml of acetic acid at 100° C.

Par conséquent, 10 min de traitement suffisent pour extraire le gossypol combiné et cette décomplexation ne doit pas être prolongée au-delà.

Choix de la longueur d'onde

Lorsqu'on étudie la variation de l'absorbance d'une solution de gossypol acétique dans l'acétonitrile/eau (50/50; v/v), on observe une absorption maximale de la radiation U.V. à 275 nm (fig. 6).

Cependant, pour doser le gossypol acétique, nous avons

choisi d'utiliser la longueur d'onde 254 nm qui est également sélectionnée pour la détection du gossypol libre. Cela permet, tout en bénéficiant d'une bonne sensibilité (fig. 6), de ne pas modifier les paramètres du spectrophotomètre U.V. en cours d'analyse.

Définition de la phase mobile

Le mélange acétonitrile/eau (50/50; v/v) présente l'avantage d'être transparent à 254 nm et d'être composé des mêmes constituants que le solvant d'extraction du gossypol.

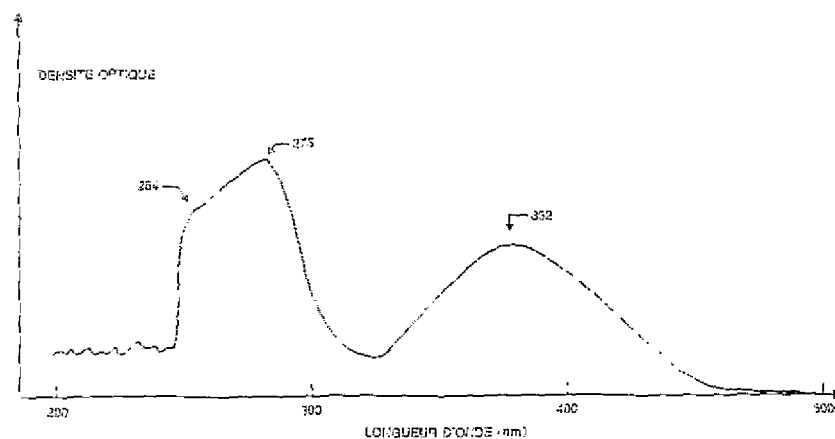


Figure 6

Variation de la densité optique d'une solution de gossypol acétique (obtenue à la suite du traitement de 2 mg de gossypol pur par 20 ml d'acide acétique selon les modalités décrites dans le texte) en fonction de la longueur d'onde. *Variation of the optical density of an acetic gossypol solution according to the wave length. 2 mg of pure gossypol was treated with 20 ml of acetic acid using the procedure described in the text.*

Afin de définir les proportions du mélange permettant la meilleure séparation du gossypol, nous avons fait varier les proportions d'acétonitrile et d'eau, acidifiée au pH 2,6 par de l'acide orthophosphorique, avec un débit d'élution de 1 ml par minute. Nous avons chromatographié un extrait obtenu après traitement à 100°C, d'amandes de graines de cotonniers Pavlikéni par l'acide acétique (fig. 7).

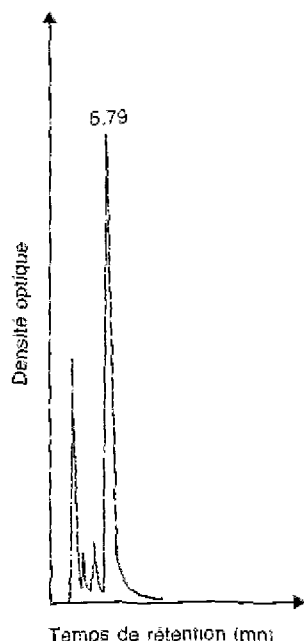


Figure 7

Chromatogramme du gossypol total d'un échantillon d'amandes de graines de cotonniers Pavlikéni. Les modalités d'analyse chromatographique sont décrites dans le texte.

Chromatogram of total gossypol in a sample of "Pavlikéni" cottonseed kernels treated using the procedure described in the text.

Nous constatons que le mélange acétonitrile/eau 88/12 permet la meilleure séparation du pic de gossypol, avec un temps de rétention inférieur à 6. Par conséquent, cette composition du mélange solvant a été retenue.

Mise en évidence, dans les dérivés des graines de cotonniers, de substances capables de réagir avec l'aniline (fig. 8)

Nous avons cherché à mettre en évidence, dans des amandes délipidées de graines de cotonniers à glandes, des substances, autres que le gossypol, capables de réagir avec l'aniline et d'interférer, par conséquent, lors du dosage colorimétrique par la méthode AOCS.

Pour réaliser cette expérience, un échantillon subit une extraction du gossypol libre par l'acétone aqueuse à 70 %. Le résidu de filtration est repris par de l'éthanol à 80 % (V/V) selon le schéma décrit dans la figure 8. Après filtration, la solution alcoolique est complétée à 50 ml et on dose à nouveau le gossypol libre par CLHP et par la méthode AOCS. La CLHP ne détecte pas de gossypol, alors que la méthode AOCS donne la valeur de 0,09 % (fig. 8). Ce résultat correspond en fait aux substances, autres que le

gossypol libre, extractibles par l'éthanol à 80 % (v/v), qui possèdent des groupements fonctionnels réagissant avec l'aniline.

Parmi ces composés, solubles dans l'éthanol à 80 %, certains sont mis en évidence par SIMO (1987) et identifiés par TCHIEGANG (1989), comme étant des acides phénoliques et des flavonoïdes oxydés en quinones.

Nos observations rejoignent celles de NOMEIR *et al.*, (1982) et de BELL *et al.* (1977) qui constatent que la méthode AOCS surévalue les résultats, surtout lorsque les échantillons renferment peu de gossypol.

Etude comparée des résultats des méthodes CLHP et AOCS (tableau 4)

Gossypol libre

Il nous a semblé intéressant de comparer les résultats obtenus avec les deux méthodes CLHP et AOCS (tableau 4).

Appliquée à des biscuits, des cookies, des cakes et du pain renfermant de la farine glandless, la CLHP ne détecte pas de gossypol libre, alors que la méthode AOCS donne 0,002 %, la même valeur que dans les graines d'*Hibiscus cannabinus* qui sont totalement dépourvues de gossypol (tableau 4).

Lorsque l'on dose le gossypol libre par la méthode AOCS, on obtient des résultats aberrants pour les échantillons qui renferment peu de gossypol, et on trouve du gossypol dans des échantillons qui n'en contiennent pas. Quelle que soit la concentration en gossypol libre de l'échantillon, la méthode AOCS donne des valeurs plus élevées que la CLHP.

On constate également que la variation des résultats entre la CLHP et l'AOCS est d'autant plus importante que la quantité de gossypol est grande [tableau 4; (2)/(1)].

En outre, le rapport entre les valeurs obtenues par la méthode AOCS et par CLHP (2)/(1) est d'autant plus faible que la quantité de gossypol est importante.

Afin de comparer les méthodes CLHP et AOCS sur des échantillons contenant des quantités importantes de gossypol, nous avons réalisé l'expérience suivante (tableau 5).

A plusieurs prises d'essai d'un même échantillon de farine de graines de cotonniers de la variété classique Pavlikéni nous avons ajouté des quantités croissantes de gossypol pur. Le gossypol libre est ensuite extrait par l'acétonitrile/eau (50/50; v/v) puis dosé successivement par CLHP et par la méthode AOCS.

Par CLHP, pour la gamme de concentration étudiée qui est de 1,29 % à 2,97 % de gossypol libre, la différence entre les valeurs calculées et trouvées n'excède pas 0,04 %.

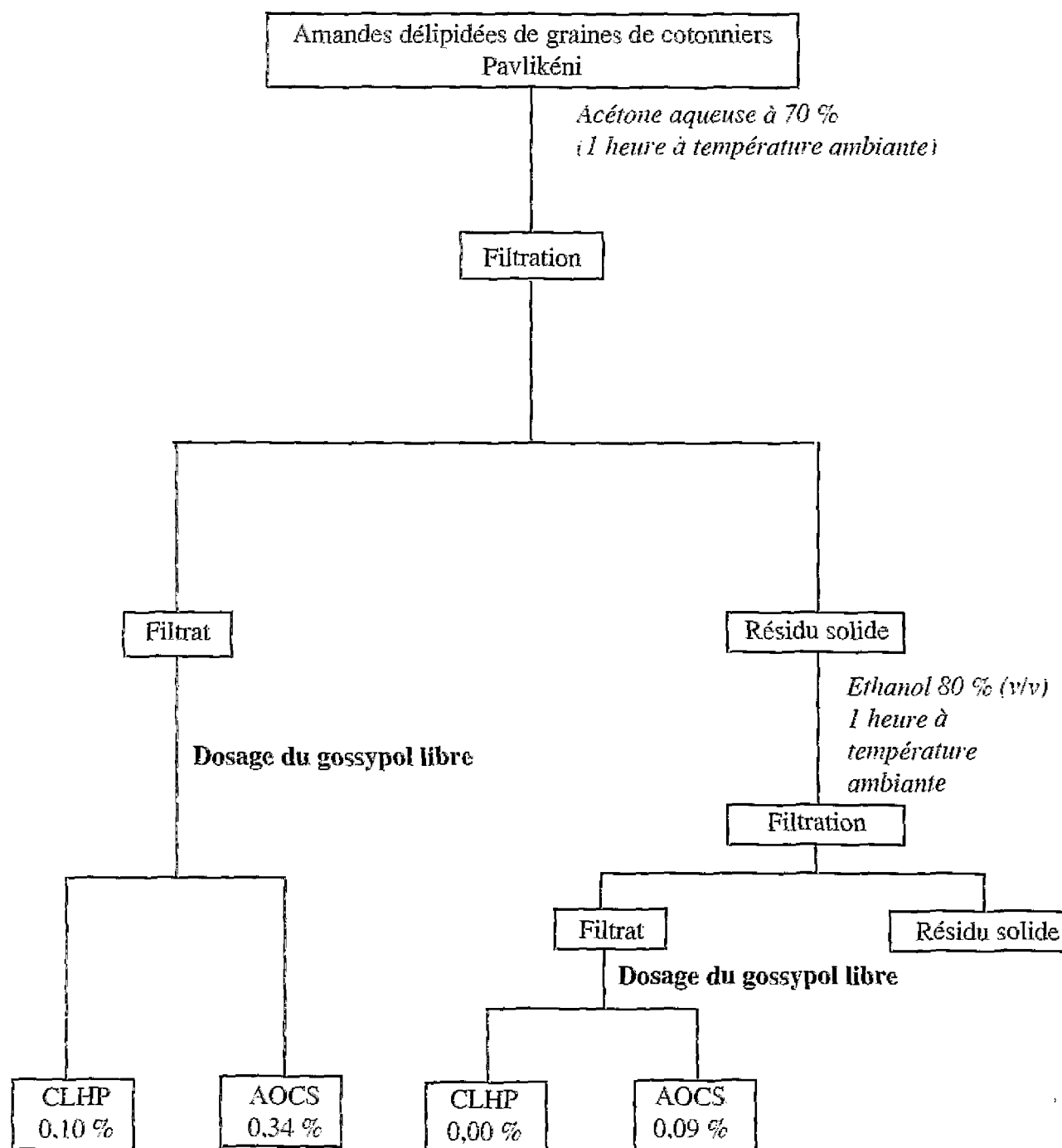


Figure 8

Dosage du gossypol libre. Mise en évidence, dans une farine de graines de cotonniers, de substances autres que le gossypol, capables de réagir avec l'aniline et d'interférer lors du dosage par la méthode AOCS.

Demonstration of the presence in cottonseed meal of substances other than gossypol able to react with aniline and interfere with AOCS method determination.

TABLEAU 4

Dosage du gossypol. Comparaison des méthodes CLHP et AOCS (résultats exprimés % matières sèche).
Gossypol determination. Comparison of the HPLC and AOCS methods.

	CLHP			AOCS			(2)-(1)	(2)/(1)
	Gossypol en % matière sèche			Gossypol en % matière sèche				
	libre (1)	combiné	total	libre (2)	combiné	total		
Amandes de graines de cotonniers classiques	0,992	0,293	1,285	1,187 (2)	0,183	1,370	0,195	1,19
Farine de graines de cotonniers glandless (INSP)	N.D.	N.D.	N.D.	0,0033		N.D.		
Farine de graines de cotonniers (Israël)	0,001	0,0052	0,006	0,005	0,065	0,070	0,004	5,00
Farine de graines de cotonniers (Texas)	0,011	0,004	0,015	0,043	0,017	0,06	0,032	3,91
Farine de graines de cotonniers glandless (GERDOC)	0,006	0,002	0,008	0,022	0,008	0,030	0,016	3,66
Cookies	N.D.	0,003	0,003	0,002	0,025	0,027		
Cakes	N.D.	0,0002	0,0002	0,002	0,018	0,020		
Biscuits extrudés	N.D.	0,015	0,015	0,002	0,041	0,043		
Pains à la farine de coton	N.D.	0,018	0,018	0,002	0,071	0,073		
Graines d' <i>Hibiscus cannabinus</i>	N.D.	N.D.	N.D.	0,002	0,016	0,018		

Les taux de gossypol combiné sont déterminés par calcul ;

N.D. = non détecté.

TABLEAU 5

Dosage du gossypol libre. Comparaison entre les méthodes CLHP et AOCS après ajout de quantités croissantes de gossypol pur (résultats exprimés en % de matière sèche).

Determination of free gossypol. Comparison of the HPLC and AOCS methods after the addition of increasing amounts of pure gossypol.

Gossypol pur ajouté (en % de matière sèche)	CLHP			AOCS		
	Valeur 1 expérimentale	Valeur 2 calculée	Différence entre les valeurs 2 et 1	Valeur 1 expérimentale	Valeur 2 calculée	Différence entre les valeurs 2 et 1
0	1,29	1,29	0,00	1,18	1,18	0,00
0,085	1,33	1,37	0,04	1,25	1,27	0,02
0,190	1,46	1,48	0,02	1,35	1,37	0,02
0,750	2,02	2,04	0,02	1,87	1,93	0,06
1,640	2,97	2,93	0,04	2,43	2,82	0,39

Avec la méthode AOCS, de même qu'avec la CLHP on n'observe pas de grandes variations entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées lorsque les teneurs en gossypol varient de 1,13 % à 1,87 %. Par contre, l'écart est important (0,39 %) quand la teneur calculée en gossypol atteint 2,82 %.

L'AOCS peut donc être utilisée pour analyser des échantillons contenant 1 à 2% environ de gossypol libre, ce qui correspond à la teneur en gossypol des dérivés de graines de cotonniers des variétés classiques.

En revanche, la CLHP peut être mise en œuvre quelle que soit la teneur en gossypol de l'échantillon.

Conclusion

Contrairement à la CLHP, les méthodes AOCS ne sont pas spécifiques. En effet, elles mettent en jeu, comme solvant d'extraction, l'acétone aqueuse qui dissout, en plus du gossypol, un certain nombre de substances qui réagissent avec l'aniline et sont comptées comme étant du gossypol. Ce phénomène qui a pour conséquence de surévaluer les résultats, est d'autant plus important que la concentration de l'échantillon en gossypol est faible.

Nous avons montré que ces méthodes ne conviennent pas pour analyser avec précision le gossypol libre et total dans les dérivés des graines de cotonniers lorsque les

Gossypol total

De même que pour le gossypol libre, on constate que les résultats obtenus pour le gossypol total avec la méthode AOCS sont toujours supérieurs à ceux donnés par CLHP. L'écart est d'autant plus important que la concentration de l'échantillon en gossypol est faible (tableau 4).

L'application de la méthode AOCS, à un échantillon de graines d'*Hibiscus cannabinus*, dépourvu de gossypol, conduit à 0,018 % de gossypol total.

échantillons renferment peu de gossypol ou des teneurs supérieures à 2%. Elles peuvent cependant être utilisées pour une gamme de concentrations allant de 1 à 2 % de gossypol.

Compte tenu de sa spécificité et de sa précision, la méthode CLHP que nous proposons ici est utilisable quelle que soit la concentration en gossypol de l'échantillon.

Du fait de sa limite très basse de détection, elle permet de doser le gossypol à l'état de traces. De plus, grâce à sa rapidité de mise en œuvre, elle peut être utilisée pour réaliser des analyses de routine.

Références bibliographiques

- ABOU-DONIA M.B., DIECKERTS W., 1975. — Toxicol appl. Pharmacol. 31-32.
- ABOU-DONIA S.A., LASKER J.M., ABOU-DONIA M.B., 1981. — High performance liquid chromatographic analysis of gossypol. *J. Chromatogr.*, 206, 606-610.
- ADAMASU A., CHANDRAVANSI B.S., 1984. — Spectrophotometric determination of total gossypol in cottonseed and cottonseed meals. *Anal. Chem.* 56, 30-32.
- ADAMS R., KIRKPATRICK E.C., 1938. — Structure of gossypol : XI. Absorption spectra of gossypol, its derivatives and of certain dinaphthalene compounds. *J. Am. Chem. Soc.*, 60, 2, 2180-2184.
- ADAMS R., MORRIS R.C., GEISSMAN T.A., BUTTERBAUGH D.J., KIRKPATRICK E.C., 1938. — Structure of gossypol. XV: An interpretation of its reactions. *J. Amer. Chem. Soc.*, 60, 2, 2193-2204.
- A.O.C.S., 1964. — Official and tentative methods of the American Oil Chemists' Society. Chicago, Illinois. Ed. by E.M. Saltee. *The Procter and Gamble Cie.* Cincinnati, Ohio.
- BELL A.A., STIPANOVIC D., HOWELL C.R., MACCE M.E., 1974. — Terpenoid aldehydes of *Gossypium* : Isolation, quantitation and occurrence. *Beltwide cotton production Research Conference*, January 7-9 1974. Dallas, Texas. 40-42.
- BELL A.A., STIPANOVIC R. D., 1977. — The chemical composition, biological activity and genetics of pigment glands in cotton. *Beltwide cotton production Research Conference*, January 10-12, Atlanta, Memphis. 244-258.
- BERARDI L.C., GOLDBLATT L.A., 1969. — Gossypol : in toxic constituents of plant food stuff. Ed. by Liener, I.E. Academic press, New York. 211-266
- BOATNER C.H., 1948. — In « Cottonseed and cottonseed products. Their chemistry and chemical technology ». A.E. Bailey, ed. Wiley (Interscience), New-York.

- BOATNER C.H., CARAVELLA M., KYAME L., 1944. — Quantitative determination of extractable gossypol in cottonseed and cottonseed meal. A spectrophotometric method. *Ind. Eng. Chem.* 16, 9, 566-572.
- BOURELY J., 1984. — La graine du cotonnier, aliment du futur. *Le Courrier CEE*, n° 86, 65 - 70.
- BOURELY J., 1985. — Recherches technologiques françaises sur les cotonniers glandless. *Proceedings of the World Conference on Emerging Technologies in the Fats and Oil Industry. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 406-408.
- BOURELY J., 1987. — Le cotonnier sans gossypol, une source de protéines alimentaires. Situation actuelle et perspectives d'avenir après le Colloque d'Abidjan. *Cot. Fib. Trop.*, 42, 1, 55-63.
- BOURELY J., 1988. — Development of glandless cottonseed in Côte d'Ivoire. *J. A.O.C.S. World Congress on Vegetable Protein Utilization*, Singapour.
- BOURELY J., BESANCON P., 1986. — La graine du cotonnier : une source de protéines de haute valeur pour l'alimentation humaine. *2èmes Journées Scientifiques du Groupement d'Etudes et de Recherches sur la Malnutrition (GERM.)*, INSERM, Vol. 136, 561-568.
- CHAN B.G., MAHONEY N., WAISS A.C., 1983. — A quantitative method for gossypol and its analogs. *Beltwide Cotton Production Research Conference*, 64-65.
- CHANGFU X., CUNHENG H., GUANGHONG B., SHANTIAN M., 1982. — Cristal structure of gossypol acetic acid. *Scientia Sinica*, 25, 11, 1194-1200.
- CHOI Y.R., RHEE K.C., 1982. — Improved analytical methods for cottonseed products. Project number C. 82-6.
- CONKERTONE J., FRAMPTON V.L., 1959. — Reaction of gossypol with free E-amino groups of lysine in proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 81, 130-134.
- CORNU A., DELPEUCH F., FAVIER J. C., 1975. — Utilisation en alimentation humaine de la graine de coton sans gossypol. *IRCT*, Paris (France) et *ORSTOM*, Yaoundé (Cameroun).
- CUQ J.L., 1981. — Modifications chimiques d'acides aminés indispensables sous l'influence de traitements technologiques alimentaires. Incidences nutritionnelles et métaboliques. *Thèse Doctorat d'Etat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc*, Montpellier.
- DAMATY S.M., HUDSON B.J.F., 1975. — Interaction of gossypol with cottonseed protein : potentiometric studies. *J. Sci. Food Agric.*, 26, 1667-1672.
- DEACON B.D., 1968. — Modified procedures for determination of gossypol pigments. II. Determination of free gossypol in low gossypol meals and of gossypol in oil. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 45, 257-258.
- EDWARDS J.D., 1970. — Synthesis of gossypol and gossypol derivatives. *Journal of the American Chemists' Society*, 47, 441-442.
- EL NOCKRASHY A.S., 1970. — Thin layer chromatography of cottonseed intraglandular pigments. *Ceras y aceites*, 21, 2, 138-141.
- HOFFPAU R.C., HARRIS J.A., HUGHES J.P., 1960. — Gossypol acetic acid as a reference standard in the determination of gossypol. *J. Assoc. of Anal. Chem.*, 43, 2, 329-331.
- HRON Sr. R.J., KUK M.S., ABRAHAM G., 1990. — Determination of free and total gossypol by high performance liquid chromatography. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 67, 3, 182-187.
- I.N.S.P., 1986. — Utilisation de la farine de coton glandless dans la réhabilitation nutritionnelle d'enfants souffrant de malnutrition protéino-énergétique grave. Rapport du contrat IRCT - CEE 1984-1987. *Institut National de Santé Publique*, Abidjan.
- LAURE J., 1973. — Acceptabilité du tourteau de coton sans gossypol au Sénégal et au Mali. *Doc. interne IRCT*, 70 p.
- LUSAS E.W. and JIVIDEN G.M., 1965. — Glandless cottonseed processing and utilization research. *Proceedings of the World Conference on Emerging Technologies in the Fats and Oil Industry. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 221-231.
- LYMAN C.M., BALIGA B.P., SLAY M.W., 1959. — Reaction of proteins with gossypol. *Arch. Biochem. Biophys.* 84, 486-497.
- LYNN A., JONES, 1979. — Gossypol and some other terpenoids, flavonoids and phenols that affect quality of cotton seed proteins. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 56, 727-730.
- MAHONEY N.E., CHAN B.G., 1985. — High performance liquid chromatographic analysis of terpene aldehydes in cotton. *Journal of chromatography*, 329, 91-98.
- MATLIN S.A., ZHOU R., 1984. — Resolution of gossypol: analytical and preparative HPLC. *Journal*

- of High Resolution Chromatography and Chromatography Communication, 7, 29-631.
- MATLIN S.A., ZHOU R., 1984. — Mass spectrophotometry of gossypol and LC/MS of gossypol and its derivatives. *Journal of High Resolution Chromatography and Chromatography Communication*, 7, 196-202.
- MARKMAN A.L., RZHEKHIN V.P., 1969. — Gossypol and its derivatives. *Israël program for scientific translation*.
- MARQUIE C., 1985. — Utilisation alimentaire des dérivés des cotonniers glandless. "Le cotonnier sans gossypol une nouvelle ressource alimentaire". *C.R. Colloque IDESSA-CIDT-TRITURAF*, Abidjan, 166-186.
- NOMEIR A.A., ABOU-DONIA M.B., 1982. — Gossypol : High performance liquid chromatographic analysis and stability in various solvents. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 59, 12, 546-549.
- NOMEIR A.A., ABOU-DONIA M.B., 1985. — Photo-decomposition of gossypol by ultra-violet irradiation. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 62, 1, 87-89.
- PODOL'SKAYA, M.Q., 1944. — Nouvelle méthode rapide de détermination du gossypol libre de la graine et du tourteau de cotonnier et du gossypol de l'huile. *Zhurnal Prikladnoi Khimii*, 17, 1-2, 657-658.
- POMINSKI J., PACK F.C., 1957. — The destruction of gossypol in cottonseed oil soapstock by a heat treatment. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 34, 299-301.
- PONS W.A., GUTHRIE J.D., 1949. — Determination of free gossypol in cotton seed materials. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 26, 671-676.
- PONS W.A., HOFFPAUIR C.L., O'CONNOR R.T., 1950. — Determination of total gossypol pigments in cottonseed materials. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 27, 390-393.
- PONS W., HOFFPAUIR C., 1957. — Determination of free and total gossypol in mixed feeds containing cottonseed meals. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 40, 4, 1068-1080.
- PONS W.A., PITTMAN R.A., HOFFPAUIR C.L., 1958. — 3-amino-1 propanol as a complexing agent in the determination of total gossypol. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 35, 93-97.
- RAJU P.K., CATER C.M., 1967. — Gas-liquid chromatographic determination of gossypol as the trimethylsilyl ether derivative. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, 44, 465-466.
- SIMO P., 1987. — Etude des facteurs physiocochimiques qui produisent une coloration des aliments renfermant de la farine de coton. *DESS Nutrition et alimentation dans les pays en développement*, USTL Montpellier.
- SMITH F.H., 1946 a. — Spectrophotometric method for estimating gossypol in crude cottonseed oil. *Ind. Eng. chem.*, 18, 1, 41-43.
- SMITH F. H., 1946 b. — Estimation of gossypol in cottonseed meal and cottonseed meals. *Ind. Eng. Chem.*, 18, 1, 43-45.
- SMITH F.H., 1958. — Spectrophotometric determination of total gossypol in cottonseed meal and cottonseed meals. *J. Amer. Oil. Chem.*, 35, 261-265.
- SMITH F.H., HALVERSON J.P., 1933. — Estimation of total and bound (D) gossypol in cottonseed meal: a modified method. *Ind. Eng. Chem.*, 5, 5, 319-322.
- STORHERR R.W., HOLLEY K.T., 1954. — Feed analysis : determination of free gossypol in mixed feeds. *J. Agric. Food Chem.*, 2, 745-747.
- WALDROUP P.W., KEYSER E.G., TOLLETT V.E., BOWEN T.E., 1968. — The evaluation of a low gossypol glandless cottonseed meal in broiler diets. *Poultry Sci.*, 47, 1179-1186.
- TCHIEGANG C., 1985. — Etude chimique de la détoxification des graines de cotonnier en vue de leur utilisation en alimentation humaine. *Mémoire de DEA, USTL (Montpellier)*.
- TCHIEGANG C., 1989. — Etude des composés phénoliques des amandes des graines de cotonniers dans l'optique de la détoxification et de l'utilisation alimentaire des amandes et de leurs dérivés. *Thèse de Doctorat, USTL Montpellier, France*, 198 p.
- YABE Y., TANS., NINOMIYA T., OKADAT., 1984. — Détermination de gossypol in edible cottonseed oil by high performance liquid chromatography. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, V, 25, 264-267.

Technical note

Determination of gossypol in cotton seed derivatives by means of high performance liquid chromatography

C. Marquié and J. Bourély

Summary

After a reminder of the principal methods used in gossypol analysis, the authors describe a method of determination of free, combined and total gossypol by high performance liquid chromatography (HPLC).

Free gossypol is extracted by acetonitrile-water (50/50, v/v) and combined or total gossypol by glacial acetic acid at 100°C. The solutions in acetonitrile-water are subjected to chromatography using UV spectrophotometry at 254 nm on an RP 18 column with a mobile phase consisting of 88% acetonitrile and 12% water acidified to 2.6 pH with concentrated phosphoric acid.

This is followed by a detailed study of the operating conditions in comparison with the AOCS methods to justify the procedure described. Applied to several samples of various origins, the

AOCS method always gives higher figures than HPLC. It gives exaggerated results for samples which contain little gossypol. It detects gossypol in samples which do not contain any.

Unlike HPLC, AOCS is not specific since aqueous acetone extracts - in addition to gossypol - substances which are capable of reacting with aniline and which may be determined as gossypol. The AOCS method cannot therefore be used for samples which contain little gossypol, such as the food derivatives of glandless cotton seeds. However, the method is suitable for samples with 1% to 2% gossypol contents.

The sensitivity of the HPLC method proposed enables the measurement of traces of gossypol. It can be applied whatever the gossypol content of the sample.

KEY WORDS: cotton plant, *Gossypium*, meal, gossypol, chromatography, method

Introduction

Gossypol is a toxic polyphenol present in the pigment glands of the vegetative organs of the classic varieties of cotton plants. As a result, the oil produced by the industrial pressing of the seeds must be refined to make it edible. The residual cake still contains gossypol. Cake is mainly used as feed for polygastric animals, which are much less sensitive to gossypol toxicity than man and monogastric animals.

The absence of the gland and the toxic pigment in glandless varieties makes the meal resulting from the pressing of the seeds of glandless cotton directly usable in

human diet. This makes glandless cotton plants a source of both textile and food, producing oil and food protein together with textile fibres like to those produced from ordinary varieties.

With a view to the sale of glandless cotton meal in the near future, very strict control is necessary to prevent the risks of poisoning that would be run if the products were still to contain gossypol. Consequently, an accurate, sensitive method of analysis is required to detect any traces of gossypol in the food derivatives of cotton seeds. This is the purpose of the present study.

Reminder of the main methods used to determine free and total gossypol in seeds

Seeds contain two forms of gossypol: the free form soluble in aqueous acetone and the fraction combined with other compounds such as lysine. The total gossypol content is the sum of the free and combined gossypol.

The gravimetric method

Podolskaia's method (1944) is based on the quantitative reduction of an alkaline copper oxide solution by gossypol.

The results are over-estimated since the reducing substances are precipitated with the gossypol.

Spectrophotometric methods

Spectrophotometric methods are based on the coloured reactions between gossypol and a number of reagents: antimony trichloride (BOATNER *et al.*, 1944) and aniline (LYMAN *et al.*, 1943; SMITH, 1946; PONS, 1957, 1958; AOCS, 1964).

The AOCS (American Oil Chemists' Society) methods are recognised as being reference methods.

Determination of free gossypol (AOCS method BA 7.58, revised in 1969)

Free gossypol is extracted by aqueous acetone 70% for 1 hour at ambient temperature. Pairs of test samples are taken after filtration in a 50 ml volumetric flask. The first aliquot is used as a control. The second is incubated with 2 ml aniline, two drops of thiourea 10% and one drop of HCl 1.2 N in a water bath at 100°C to form a yellow-orange "dianilino gossypol" complex. The intensity of the colour of this solution (taken to 25 ml with aqueous isopropyl alcohol 80%) expressed as optical density is compared to that of the extract without aniline measured at 440 nm by UV spectrophotometry. The percentage of gossypol in the sample is calculated by using a standard line plotted using pure gossypol, which gives the variations in the gossypol level according to the optical density.

Determination of total gossypol (AOCS method BA 8.55, corrected in 1964)

The sample is hydrolysed at 75°C for 6 hours using an azeotropic mixture of oxalic acid, water and methyl ethyl ketone to release the combined form of gossypol. Barium acetate solution is then added to eliminate excess oxalic acid by precipitating barium oxalate. After filtration, the solution is taken to 100 ml with aqueous acetone 70%. Spectrophotometric analysis of aliquots of this solution is performed as for free gossypol, except that neither thiourea

nor HCl is added and the spectrophotometer reading is performed at 442 nm.

Chromatographic methods

Gravimetric and spectrophotometric analyses are not accurate enough to quantify gossypol at concentrations of less than 100 ppm (Pons, 1967) and chromatography must be used.

Thin layer chromatography (TLC)

EL NOCKRASHY (1970) used TLC to separate and identify several intragland pigments from cotton seeds. Thin layer chromatography was also used by RAJU *et al.* (1967) to purify trimethylsilyl derivatives of gossypol before gas chromatography.

Gas chromatography (GC)

Silylation of gossypol by trimethylsilyl derivatives stabilises it and makes it volatile and usable in gas chromatography (RAJU *et al.*, 1967; CHAN *et al.*, 1983).

High performance liquid chromatography (HPLC)

Gossypol, extracted by a more or less polar mixture of solvents, is generally quantified at ambient temperature on a C18 non-polar column in inverse phase. Gossypol is eluted isocratically by a polar mobile phase and detected by UV spectrophotometry.

Table 1 shows the different determination methods, the gossypol extraction solvent, column characteristics and the eluents used.

Except for the method published recently by HRON *et al.* (1990), the chromatography methods described in the literature can only determine gossypol in a single form - free or total. This led us to designing a method for the separate determination of free gossypol and combined or total gossypol.

Description of the HPLC method proposed

The samples analysed

The following samples were analysed:

- kernels of seeds of the Bulgarian variety Pavlikéni (*Gossypium hirsutum* L.);
- glandless cottonseed meal prepared by IRCT and used for the nutritional rehabilitation of children suffering from malnutrition by ENSP in Abidjan within the framework of an EC-financed study (INSP, 1986);
- glandless cottonseed meal sold by Milouot, Haifa (Israel);
- Texan glandless cottonseed meal;

- glandless meal from Côte d'Ivoire obtained in 1986 by direct hexane extraction by GERDOC, Pessac (France);
- cakes and biscuits prepared in our laboratory and in which 20% of the wheat flour was replaced by glandless cottonseed meal from Côte d'Ivoire;
- extruded biscuits manufactured in a pilot workshop and containing 19% glandless cottonseed meal from Côte d'Ivoire;
- bread sold in Europe containing cottonseed meal. The exact proportions of the various ingredients are not known;
- *Hibiscus cannabinus* L. (Malvaceae) leaves (gossypol-free control).

Material used

A Waters chromatograph consisting of a 680 automatic gradient controller connected to two 510 pumps, an RP 18 column (L 250 mm, ID 4 mm with 5 μ m particles) and a 481 LC spectrophotometer. The mobile phase consisted of 88% acetonitrile and 12% water acidified to pH 2.6 with phosphoric acid. The elution rate was 1 ml/min and gossypol was detected at 254 nm. The results were recorded and computed by a Shimadzu CR3A integrator.

Procedure

Test sample

Sample size for analysis was such as the amount of gossypol expected did not exceed 3 mg in 50 ml of solution to be analysed (Table 2).

Extraction and determination of free gossypol (Fig. 1)

A sample of pure gossypol and a test sample were processed for 2 hours at ambient temperature with 40 ml of acetonitrile/water mixture (50/50, v/v). After filtration on cotton, the solutions were made up to 50 ml with acetonitrile/water (50/50, v/v) in a volumetric flask. The solutions were then filtered on a 0.2 μ m membrane and injected in the chromatograph (Figure 2).

Extraction and determination of combined gossypol

After the extraction of free gossypol by the acetonitrile/water (50/50, v/v), the filtration residues were resuspended in 20 ml of acetic acid at 100°C for 10 min. The acid extracts were filtered on cotton and made up to 50 ml with acetonitrile/water (50/50, v/v). The filtrates were then filtered on a 0.2 μ m membrane and injected in the chromatograph.

To achieve balanced dissociation of acetic gossypol in the solvent, a wait of at least 3 hours is required before the injection of the solutions; the latter can be prepared the day before injection.

Detailed study of the procedure in comparison with the AOCS methods

Free gossypol. Choice of extraction solvent

An ethanol/water/ether mixture (57/27/17, v/v/v) was used as gossypol extraction solvent by SMITH (1946) and aqueous acetone 70% was used by PONS and GUTHRIE (1949). This solvent was taken over by the American Oil Chemists' Society for use in the official methods BA 7.58 and BA 8.55.

We first used aqueous acetone to extract free gossypol (using the AOCS procedure) before HPLC determination. The chromatogram obtained displays an extremely large peak, caused by the solvent, which masks the gossypol

The procedure applied to a sample of 'Pavlikeni' cotton seed is shown in Figure 1.

Extraction and determination of total gossypol

The following method is used for direct determination of total gossypol.

A finely ground test sample is hydrolysed under reflux for 10 min in a water bath at 100°C by 20 ml of glacial acetic acid. Simultaneously, two 1 to 2 mg test samples of pure gossypol are treated in the same way. The solutions are then filtered on cotton in 50 ml volumetric flasks. The solid residues are washed several times with acetonitrile/water (50/50, v/v). The filtrates are made up to 50 ml with the same solvent and agitated.

Results

Two control samples of pure gossypol at different concentrations must be included in each series of analyses for calibration purposes. After chromatography of the filtered (0.2 μ m membrane) samples and control solutions, the integrator compares the peak areas of the control gossypol and the samples. An integrator program gives the results as concentrations.

The results can also be calculated as follows, giving the gossypol content per 100g of sample:

$$y = \frac{(T1 + T2) \times S \times 10}{(S1 + S2) \times M}$$

in which:

- T1 and T2 are the quantities of pure gossypol (in mg) in 50 ml of control solutions;
- S1 and S2 are the respective peak areas of the gossypol in control solutions 1 and 2;
- S is the peak area of the gossypol in the sample;
- M (in mg) is the test sample.

peak. To overcome this problem, the acetone and water are evaporated to dryness and the extract resuspended in acetonitrile/water (50/50, v/v) and injected. Under these conditions, since the dry extract contains lipids the dissolving of gossypol takes a long time and is even incomplete, which affects the accuracy of the method. We therefore discarded this solvent mixture for that recommended by ABOU-DONIA *et al.* (1981) (ethanol/water/ether/acetic acid, 715/285/200/0.2). This solvent is more effective in dissolving the solid residue but resulting in the dividing in two of the gossypol peak if one waits more than two hours before injecting the solution.

After acetone, acetonitrile is the solvent in which gossypol is most stable (NOMEIR *et al.*, 1982). We determined that two hours of extraction with acetonitrile/water (50/50, v/v) is sufficient to put 99% of free gossypol into solution. In addition, no splitting of the peak occurred for 24 hours after the preparation of the solution (Figure 2).

For this reason, acetonitrile/water (50/50, v/v) was chosen as a solvent for gossypol extraction.

Influence of the nature of the solvent and the duration of the extraction of free gossypol

Aniline is used as a reagent in the AOCS method; substances other than gossypol have a coloured reaction with aniline which exaggerates the result. The extraction solvent must be selective for gossypol, i.e. it must dissolve all the gossypol and not the other compounds which might exaggerate the apparent gossypol content.

HPLC is perfectly selective since gossypol is identified as a single chromatographic peak whose area is proportional to the quantity of gossypol.

Comparison of the difference between the results of the two methods and use of different types of solvent can show whether the extraction solvent is selective or not. Investigation was carried out using seed from the classic cotton variety 'Pavlikéni'. Acetonitrile/water (50/50, v/v) and aqueous acetone 70% were compared with extraction times ranging from 30 min to 4 h (Table 3).

** Extraction of free gossypol by acetonitrile/water (50/50, v/v)*

The results of gossypol assay by HPLC and the AOCS method after extraction by acetonitrile/water (50/50, v/v) are almost identical (Table 3). However, with extraction times of 30 min to 1 h, HPLC gave slightly higher gossypol contents than the AOCS method. The AOCS method gave higher gossypol contents than HPLC when extraction was continued for 2 h or more. The difference between the values obtained with the two methods increased according to the duration of extraction but remained slight.

The averages of the results of the two methods are comparable. This shows that whatever the duration of extraction, the acetonitrile/water mixture does not dissolve any substance other than gossypol which can combine with aniline.

However, the acetonitrile/water mixture extracts an increasing amount of gossypol after over 2 hours of extraction (Table 3). A proportion of the combined gossypol is released from the protein-gossypol complex when subjected to the prolonged effect of the acetonitrile/water mixture which operates hydrolysis.

This observation leads to concluding that the extraction of free gossypol by acetonitrile/water (50/50, v/v) should not be continued for more than two hours.

** Extraction of free gossypol with acetone/water (70/30) mixture*

To perform HPLC determination of the gossypol extracted by aqueous acetone, the solvent is evaporated to dryness and the residue resuspended in 50 ml of acetonitrile/water mixture (50/50, v/v). The free gossypol content assayed by HPLC remains constant when extraction continues for over 30 min (Table 3). One hour of extraction by aqueous acetone is thus sufficient for the complete dissolving of the gossypol.

It can be seen that the AOCS method always gives higher values than HPLC. The divergence between the results increases according to the extraction time. It can be concluded from our observations that with extraction times of 1 to 4 h, aqueous acetone extracts the same amount of free gossypol but also extracts other substances which are determined as gossypol by the AOCS method.

Comparison of the HPLC results also shows that acetonitrile/water mixture extracts more gossypol than aqueous acetone (1.10% against 0.90%) during a 2-hour extraction period, for example.

This explains why practically the same results are obtained when gossypol is extracted by acetonitrile/water and by aqueous acetone and then assayed using the AOCS method. More gossypol is extracted in the first case, while in the second the aqueous acetone simultaneously dissolves substances other than gossypol. It has also been observed that HPLC always gives higher results when acetonitrile/water is used as an extraction solvent rather than aqueous acetone. These differences result from the destruction of part of the gossypol during evaporation of the aqueous acetone.

These results also show that HPLC and AOCS methods give comparable results when the sample contains about 1% gossypol.

Procedure for the analysis of combined gossypol

Choice of reagent for the hydrolysis of combined gossypol

Gossypol is bound by its aldehydes to the amine groups of protein amino acid residues and forms a stable macromolecular complex which is insoluble in aqueous acetone, chloroform and ethyl ether. Moisture is a factor in the combination of free gossypol by bursting the pigment glands and by increasing amino gossypol interactions. An increase in temperature also enhances gossypol combination. It can be assumed that there is a change in the structure of the proteins, leaving more NH_2 sites available which may become fixed to free gossypol.

Hydrolysis using oxalic acid (AOCS, 1964) or acetic acid in the presence of a chelating reagent such as β -amino 1-propanol (PONS, 1958) is used to free the gossypol from the complex formed with proteins.

In our method, glacial acetic acid is used at 100°C for 10 min to break the amino gossypol bonds and form a stable gossypol-acetic acid complex in the acetonitrile-water mixture (50/50, v/v).

Stability of the gossypol solution after decomposition of the complex

When pure gossypol is treated with 20 ml of acetic acid at 100°C for 10 min, and this solution is made up to 50 ml with pure acetonitrile, the acetic gossypol solution turns fluorescent yellow with persistent intensity. It is therefore not possible to analyse such a solution using UV absorption spectrophotometry.

An increase in absorption with time and a decrease in the colour of the solution will therefore be observed over a 3-hour period if chromatography is applied every 15 min to an acetic gossypol solution in acetonitrile/water (50/50, v/v) (Figure 3).

The acetic gossypol solution remains relatively stable for 48 hours after preparation of the sample. In addition, analysis of standard gossypol solutions prepared by successive dilutions with acetonitrile/water (50/50, v/v) of a mother solution resulting from the treatment of a known quantity of pure gossypol with acetic acid gives a non-linear curve of the variation in optical density according to the gossypol concentration. Indeed, acetic gossypol breaks down in water in a balanced reaction which requires at least 3 hours to become stabilised. The addition of water shifts the balance in a direction which tends to reduce the amount of acetic gossypol determined.

Acetic acid treatment of combined gossypol is thus possible on condition that water is added to the reaction mixture after extraction and that the preparation is left for sufficient time to attain acetic gossypol break-down equilibrium (at least 3 hours).

We therefore do not calibrate the integrator with successive dilutions of the same control solution of pure gossypol but by direct determination of several test samples of increasing concentrations of pure gossypol. Figure 4 shows that under these conditions the variation of optical density according to the gossypol concentration is a linear function and therefore follows Lambert Beer's law.

Kinetics of the decomposition of combined gossypol

Test samples of 100 mg of 'Pavlikéni' cotton seed kernels were treated with 20 ml of acetic acid at 100°C in a water bath for 5, 10, 20, 30, 60, 120 and 180 min. The extracts were subjected to chromatography 3 hours after preparation. Maximum absorption was observed for the sample treated for 10 min (Figure 5).

It was also found that in a sample which had been subjected to over 30 min of treatment the chromatograms displayed other peaks (of varying area) which could not be

attributed to gossypol. This was caused by the degradation of gossypol and the release of other molecules into the reaction medium.

In view of this, 10 min of treatment is sufficient for the extraction of combined gossypol. Decomposition should not be continued for a longer period of time.

Choice of wave length

Study of the absorption variation of an acetic gossypol solution in acetonitrile/water (50/50, v/v) shows maximum absorption of UV radiation at 275 nm (Figure 6).

However, it was chosen to determine acetic gossypol at 254 nm, the wave length also used for the detection of free gossypol. This conserves good sensitivity (Figure 6) without modification of the UV spectrophotometer parameters during analysis.

Definition of the mobile phase

The acetonitrile/water mixture (50/50, v/v) has the advantage of being transparent at 254 nm; it has the same constituents as the gossypol extraction solvent. The proportions were defined by varying the proportions of acetonitrile and water acidified to pH 2.6 with orthophosphoric acid with an elution rate of 1 ml/min. An extract of 'Pavlikéni' cotton seed kernels prepared by acetic acid treatment at 100°C was chromatographed (Figure 7).

It was found that an 88/12 acetonitrile/water mixture gave the best separation of the gossypol peak with a retention time of less than 6 min. This solvent mixture was therefore chosen.

The detection in cotton seed of substances capable of reacting with aniline (Figure 8)

It was sought to detect in pressed kernels of glanded cotton substances other than gossypol which reacted with aniline and which would therefore interfere with the colorimetric analysis of the AOCS method.

For the experiment, free gossypol was extracted from a sample by aqueous acetone 70%. The filtration residue was resuspended in ethanol 80% (v/v) as shown in Figure 8. After filtration, the alcohol solution was made up to 50 ml and the free gossypol was determined again by HPLC and the AOCS method. No gossypol was detected by HPLC, whereas the AOCS method showed 0.09% (Figure 8). This figure in fact represents substances other than free gossypol which are extractable by ethanol 80% (v/v) and possess functional groups which react with aniline.

The presence of some of these compounds was demonstrated by SIMO (1987) and identified by TCHIEGANG (1989) as phenolic acids and flavonoids oxidised into quinones.

Our observations agree with those of NOMEIR *et al.* (1982) and BELL *et al.* (1977) who observed that the AOCS method overestimates results, especially when the samples contain little gossypol.

Comparative study of the results of HPLC and the AOCS method (Table 4)

Free gossypol

It appeared interesting to compare the results obtained by HPLC and the AOCS method (Table 4). HPLC analysis of dry biscuits, cookies, cakes and bread containing glandless cottonseed meal did not reveal any gossypol, whereas the AOCS method gave 0.002%, the same value found in seed of *Hibiscus cannabinus* which contain no gossypol at all (Table 4).

When free gossypol is determined using the AOCS method, the results are inaccurate for samples containing small amounts of gossypol and gossypol is found in samples which do not contain any. The AOCS method gives higher values than HPLC, whatever the free gossypol concentration in the sample. It was also found that the difference in AOCS and HPLC results increased with the amount of gossypol (Table 4; (2) - (1)). In addition, the ratio of AOCS results to HPLC results (2)/(1) decreased as the amount of gossypol increased.

The following experiment was carried out to compare HPLC and the AOCS method in the analysis of samples containing large quantities of gossypol (Table 5). Increasing

amounts of pure gossypol were added to several test samples from the same sample of cottonseed meal prepared using the classic 'Pavlikéni' variety. The free gossypol was then extracted by acetonitrile/water (50/50, v/v) and then determined using HPLC and the AOCS method successively.

In the free gossypol concentration range 1.29% to 2.97% studied, the difference between the calculated and HPLC values did not exceed 0.04%. With the AOCS method - as with HPLC - the difference between experimental and calculated values was small for 1.18% to 1.87% gossypol contents. However, the deviation was substantial (0.39%) when the calculated gossypol content attained 2.82%.

The AOCS method can therefore be used to analyse samples containing approximately 1 to 2% free gossypol. This corresponds to the gossypol contents of derivatives of seeds of classic cotton varieties. In contrast, HPLC can be used for any gossypol content in a sample.

Total gossypol

As for free gossypol, it was found that the results obtained using the AOCS methods were higher than HPLC results in all cases. The difference increased as the gossypol concentration in the sample decreased (Table 4).

Application of the AOCS method to a sample of gossypol-free *Hibiscus cannabinus* seeds gave a 0.018% gossypol content.

Conclusion

Unlike HPLC, the AOCS methods are not specific. The solvent used is aqueous acetone, which not only dissolves gossypol but also a number of substances which react with aniline and are counted as gossypol. This leads to over-estimation of the results, especially when the sample contains a small gossypol concentration.

We have shown that these methods are not suitable for the accurate analysis of free and total gossypol in cottonseed

derivatives when the samples contain little or over 2% gossypol. They can nevertheless be used for a 1 to 2% gossypol range.

Because of its specificity and accuracy, the HPLC method proposed here can be used for any gossypol concentration in a sample. Its very low detection threshold enables the determination of traces of gossypol and its rapidity means that it can be applied in routine analyses.

Dosificación del gossipol, mediante la cromatografía en fase líquida de altas cualidades técnicas, en los derivados de las semillas del algodónero

C. Marquié y J. Bourély

Resumen

Después de recordar cuáles son los principales métodos de análisis del gossipol, los autores describen el método de dosificación del gossipol libre, combinado y total en los derivados de las semillas del algodónero mediante la HPLC.

El gossipol libre es extraído mediante el acetonitrilo/agua (50/50; v/v) y el gossipol combinado o total mediante el ácido acético glacial a 100°C. En el acetonitrilo/agua las soluciones son cromatografiadas por espectrofotometría UV a 254 nm en una columna RP 18 con una fase móvil compuesta por el 88% de acetonitrilo y del 12% de agua acidificada de pH 2.6 con ácido fosfórico concentrado.

Luego se hace un estudio comparativo detallado de las condiciones del experimento y de los métodos de referencia del AOCS con el fin de justificar el protocolo del experimento que ha sido definido. El método AOCS, aplicado a varias muestras de

or genes diferentes, siempre da resultados superiores a los del método HPLC. Da resultados exagerados en las muestras que contienen poco gossipol y evalúa a éste en muestras que no contienen gossipol.

A diferencia del AOCS, el HPLC no es específico puesto que la acetona extrae, además del gossipol, sustancias capaces de reaccionar con anilina y de ser dosificadas como si fueran gossipol. Por lo tanto, no se puede utilizar el AOCS en muestras que contienen poco gossipol, como por ejemplo los derivados alimenticios de las semillas de algodóneros sin glándula. En cambio, es perfectamente adecuado para las muestras cuyo contenido de gossipol varía entre 1 y 2%.

Por su sensibilidad, el método HPLC permite dosificar el gossipol al estado de huellas. Además, se puede aplicar a cualquier que sea el contenido de gossipol de la muestra.

PALABRAS CLAVE: algodónero, harnas, gossipol, cromatografía, método.